

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

Selektion von monoklonalen Antikörpern

Patent number: DE19900635
Publication date: 2000-07-13
Inventor: MOLDENHAUER GERHARD (DE); POUSTKA ANNEMARIE (DE);
BREITLING FRANK (DE)
Applicant: DEUTSCHES KREBSFORSCH (DE)
Classification:
- **international:** C07K16/00; C07K14/435; C12N15/12; C12N15/63; C12N5/10
- **european:** C07K14/315, C07K14/705W, C07K16/12A12, C07K16/18, C07K16/40
Application number: DE19991000635 19990111
Priority number(s): DE19991000635 19990111

Also published as:

WO0042176 (A1)

EP1141271 (A1)

Abstract of DE19900635

The present invention relates to a method for selecting monoclonal antibodies. The method comprises the fusion of B-lymphocytes with myeloma cells to form hybridoma cells that produce antibodies. The antibodies are presented on the cell surface of the hybridoma cells by an antibody-binding protein. The invention also relates to the binding of antibodies to antigens and to means which can be used therefor.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 199 00 635 A 1**

⑤① Int. Cl.7:
C 07 K 16/00
C 07 K 14/435
C 12 N 15/12
C 12 N 15/63
C 12 N 5/10

②① Aktenzeichen: 199 00 635.0
②② Anmeldetag: 11. 1. 1999
④③ Offenlegungstag: 13. 7. 2000

DE 199 00 635 A 1

⑦① Anmelder:
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

⑦④ Vertreter:
Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea
Schüßler, 81825 München

⑦② Erfinder:
Breitling, Frank, 69120 Heidelberg, DE; Poustka,
Annemarie, 69120 Heidelberg, DE; Moidenhauer,
Gerhard, 69120 Heidelberg, DE

⑤⑤ Entgegenhaltungen:
J.Bacteriol. 148, 1981, S. 265-273;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Selektion von monoklonalen Antikörpern

⑤⑦ Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion von monoklonalen Antikörpern, umfassend die Fusion von B-Lymphozyten mit Myelomzellen zu Antikörper-produzierenden Hybridomzellen; wobei die Antikörper auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen mittels eines Antikörper-Bindeproteins präsentiert werden, und die Bindung der Antikörper an Antigene. Ferner betrifft die Erfindung hierfür verwendbare Mittel.

DE 199 00 635 A 1

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Selektion von monoklonalen Antikörpern sowie hierfür verwendbare Mittel.

Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern beruht auf einem von Köhler und Milstein entwickelten Verfahren. Nach diesem Verfahren werden B-Lymphozyten mit Myelomzellen fusioniert, wodurch Antikörper-produzierende Hybridomzellen erhalten werden. Ein solches Verfahren weist große Nachteile auf. Insbesondere ist es aufwendig Antikörper zu selektionieren, da dies eine getrennte Kultivierung von Hybridomzellen erfordert. Letzteres führt auch dazu, daß nur eine begrenzte Zahl von Hybridomzellen erfaßt und somit auch nicht alle Antikörper selektioniert werden können, was insbesondere nachteilig ist, wenn Antikörper mit höchster Affinität für ein Antigen selektioniert werden sollen.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem monoklonale Antikörper hergestellt werden können, wobei vorstehende Nachteile vermieden werden.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den Erkenntnissen des Anmelders, daß monoklonale Antikörper auf der Zelloberfläche von Hybridomzellen mittels eines Antikörper-Bindeproteins präsentiert werden können. Er hat erkannt, daß hiermit monoklonale Antikörper selektioniert werden können, ohne daß Hybridomzellen getrennt kultiviert werden müssen. Auch hat er erkannt, daß die Selektion von monoklonalen Antikörpern sowohl gegenüber einem bestimmten als auch vielen (un)bestimmten Antigenen einer Antigen-Bibliothek erfolgen kann. Ferner hat er erkannt, daß die Selektion von monoklonalen Antikörpern auch hinsichtlich ihrer Affinitätsstärke zu bestimmten Antigenen erfolgen kann.

Erfindungsgemäß werden die Erkenntnisse des Anmelders genutzt, ein Verfahren zur Selektion von monoklonalen Antikörpern bereitzustellen. Ein solches Verfahren umfaßt die Fusionierung von B-Lymphozyten mit Myelomzellen zu Antikörperproduzierenden Hybridomzellen, wobei die Antikörper auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen mittels eines Antikörper-Bindeproteins präsentiert werden, und die Bindung der Antikörper an Antigene.

Der Ausdruck "B-Lymphozyten" umfaßt B-Lymphozyten jeglicher Art und Abstammung. Auch können es Vorstufen von B-Lymphozyten sein. Ferner können die B-Lymphozyten von Tieren, wie Mäusen, Ratten, Kaninchen, etc., oder dem Menschen stammen. Desweiteren können die B-Lymphozyten von einem gesunden oder kranken Organismus stammen. Günstig ist es, wenn sie von einem immunisierten Organismus stammen. Besonders günstig ist es, wenn die B-Lymphozyten für humane Antikörper oder Teile davon kodieren. Handelt es sich um B-Lymphozyten aus Tieren, ist dies erreichbar, indem die Tiere für die humanen Antikörper bzw. Teile davon transgen sind. Die Herstellung solcher Tiere kann durch übliche Verfahren erfolgen, wobei sich anbietet, die Gene für die humanen Antikörper die Teile davon in embryonale Stammzellen einzuführen, aus denen dann die Tiere generiert werden. Die Bereitstellung von B-Lymphozyten und ihren Vorstufen kann durch übliche Verfahren erfolgen.

Der Ausdruck "Myelomzellen" umfaßt Myelomzellen jeglicher Art und Abstammung. Auch können es Vorläufer von Myelomzellen sein. Ferner können die Myelomzellen von Tieren, wie Mäusen, Ratten, Kaninchen, etc., oder dem Menschen stammen. Bevorzugte Myelomzellen sind Abkömmlinge der Maus-Stämme P3K, P3-X63.Ag8,

X63.Ag8.653, NSO/1, Sp2/O-Ag14 und F0, der Ratten-Stämme Y3-Ag1.2.3, YB2/0 und IR9834, und der menschlichen Stämme U266, SK007 und Karpas 707. Die Bereitstellung von Myelomzellen und ihren Vorstufen kann durch übliche Verfahren erfolgen.

Der Ausdruck "Antikörper-produzierende Hybridomzellen" umfaßt Zellen, die durch Fusion von B-Lymphozyten und Myelomzellen entstehen und Antikörper produzieren. Es wird auf die Ausführungen hinsichtlich B-Lymphozyten und Myelomzellen entsprechend verwiesen. Hybridomzellen können tierische und/oder menschliche Nukleinsäuren bzw. Proteine aufweisen. Die Kultivierung von Hybridomzellen kann durch übliche Verfahren erfolgen. Ferner kann es günstig sein, wenn die Hybridomzellen Rekombinasen, z. B. Rag1 oder Rag2, und/oder Mutasen (über)exprimieren. Solches kann durch Transfektion der Hybridomzellen mit entsprechenden Expressionsvektoren erreicht werden. Der Fachmann kennt solche Expressionsvektoren.

Der Ausdruck "Fusion von B-Lymphozyten mit Myelomzellen" betrifft jegliches Verfahren, mit dem diese Zellen fusioniert werden können. Günstig ist ein Verfahren, bei dem die Zellen über Polyethylenglykol fusioniert werden. Es wird auf die Beispiele verwiesen.

Der Ausdruck "Bindung der Antikörper an Antigene" betrifft jegliches Verfahren, mit dem die auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen exprimierten Antikörper an Antigene binden können. Die Antigene können an Trägern, z. B. Magnetbeads, gebunden sein. Ferner können sie markiert, z. B. fluoreszenzmarkiert, sein. Als Fluoreszenzmarker bieten sich z. B. FITC, TRITC, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7 und Phycoerythrin an. Desweiteren können die Antigene an Biotin gekoppelt sein. Gebundene Antigene können dann durch übliche Verfahren, z. B. FACS-Analyse, nachgewiesen werden, wodurch auch die entsprechenden Antikörper detektiert werden. Es wird auf die Beispiele verwiesen.

Der Ausdruck "Antikörper-Bindeprotein" umfaßt jegliches Protein, das einen Antikörper binden und an der Zelloberfläche von Hybridomzellen präsentieren kann. Insbesondere kann das Protein ein Signalpeptid, eine von der Spezifität des Antikörpers unabhängige Antikörper-Bindestelle und einen Membrananker aufweisen. Beispiele für ein solches Protein sind natürliche Fc-Bindeproteine, wie CD16, CD32 und CD64. Ferner kann das Protein eine Kombination aus einem Signalpeptid, einer Antikörper-Bindestelle und einem Membrananker aufweisen, die in der Natur nicht vorkommt. Eine solche Kombination kann Teile natürlicher Fc-Bindeproteine umfassen. Ferner kann sie als Signalpeptid ein solches einer Maus-Ig-Kappa-Kette oder eines Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, als Membrananker eine Transmembran-Domäne von PDGFR oder CD52 und als Antikörper-Bindestelle eine Antigen-Bindungsdomäne eines bakteriellen Proteins, wie Protein A, Protein G, Protein L oder Protein LG, aufweisen. Günstig kann es sein, wenn die Kombination mehrere Signalpeptide, Antikörper-Bindestellen und/oder Membrananker aufweist. Besonders günstig kann es sein, wenn das Antikörper-Bindeprotein, insbesondere die Antikörper-Bindungsdomäne der bakteriellen Proteine Codons aufweist, die für die Expression in Säugerzellen optimiert sind. Der Fachmann weiß, um welche Codons es sich hier handelt.

Bevorzugte Antikörper-Bindeproteine sind in den Fig. 1-3 angegeben. Das Antikörper-Bindeprotein von Fig. 1 umfaßt das Signalpeptid eines Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, vier Antikörper-Bindungsdomänen des Proteins L und die Transmembran-Domäne von CD52. Die DNA- und Aminosäuresequenzen des Antikörper-Bindeproteins sind zwischen den Nukleotid-Nummern 682-1782 angegeben. Das Antikörper-Bindeprotein von Fig. 2 umfaßt das Si-

gnalpeptid einer Maus-Ig-Kappa-Kette, zwei Antikörper-Bindestellen des Proteins G und die Transmembran-Domäne von CD52. Die DNA- und Aminosäuresequenzen des Antikörper-Bindeproteins sind zwischen den Nukleotid-Nummern 647-1420 angegeben. Das Antikörper-Bindeprotein von Fig. 3 umfaßt das Signalpeptid des Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, zwei Antikörper-Bindestellen des Proteins G und die Transmembran-Domäne von PDGFR. Die DNA- und Aminosäuresequenzen des Antikörper-Bindeproteins sind zwischen den Nukleotid-Nummern 682-1431 angegeben. Die Antikörper-Bindestellen aller drei Antikörper-Bindeproteine weisen auf DNA-Ebene Codons auf, die für die Expression in Säugetierzellen optimiert sind.

Ein Antikörper-Bindeprotein der Fig. 1, 2 bzw. 3 kann eine Aminosäuresequenz aufweisen, die sich durch ein oder mehrere Aminosäuren von der Aminosäuresequenz in den Fig. 1, 2 bzw. 3 unterscheidet. Die Unterschiede können in Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von einzelnen Aminosäuren liegen. Allerdings hybridisiert die DNA dieses Antikörper-Bindeproteins mit der in den Fig. 1, 2 bzw. 3 angegebenen DNA. Der Ausdruck "Hybridisierung" weist auf eine Hybridisierung unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, hin. Ferner weist das Antikörper-Bindeprotein mit der veränderten Aminosäuresequenz Gesamt- bzw. Teilfunktionen auf, die mit jenen des Antikörper-Bindeproteins der Fig. 1, 2 bzw. 3 vergleichbar sind.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Nukleinsäure, die für ein vorstehendes Antikörper-Bindeprotein kodiert. Die Nukleinsäure kann eine RNA oder eine DNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

- (a) Die DNA eines Antikörper-Bindeproteins der Fig. 1, 2 bzw. 3, eine sich hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterscheidende DNA, oder
- (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Der Ausdruck "eine sich durch ein oder mehrere Basenpaare unterscheidende DNA" umfaßt jegliche für ein Antikörper-Bindeprotein der Fig. 1, 2 bzw. 3 kodierende DNA, die mit der DNA der Fig. 1, 2 bzw. 3 hybridisiert. Die Unterschiede können in Additionen, Deletionen, Substitutionen und/oder Inversionen von einzelnen Basenpaaren liegen. Hinsichtlich des Ausdrucks "Hybridisierung" wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Eine erfindungsgemäße DNA kann als solche oder in Kombination mit jeglicher anderen DNA vorliegen. Insbesondere kann eine erfindungsgemäße, für ein Antikörper-Bindeprotein kodierende DNA in einem Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für *E. coli* sind dies z. B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z. B. pY100 und Ycpad1 zu nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z. B. pKCR, pEFBOS, pCDM8 und pCEV4 anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

Der Fachmann weiß, in welcher Weise die erfindungsgemäße DNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese DNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße DNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann.

Bevorzugte Expressionsvektoren, die eine erfindungsge-

mäßige DNA enthalten, sind in den Fig. 1-3 angegeben. Es handelt sich um die Expressionsvektoren pSEX11L4, pSEX11G2* und pSEX15G2. Diese wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) am 14. Dezember 1998 hinterlegt. Im einzelnen wurde pSEX11L4 unter DSM 12580, pSEX11G2* unter DSM 12581 und pSEX15G2 unter DSM 12582 hinterlegt.

Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um die erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende DNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die *E. coli*-Stämme XL-1 Blue, Top 10 F, HB101, DH5 α , x1776, JM101, JM109, BL21 und SG13009, die Hefestämme *Saccharomyces cerevisiae* und *Pichia pastoris*, die tierischen Zellen L, NIH 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero, HeLa, Myelom- und Hybridomzellen sowie die Insektenzellen sf9.

Desweiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. transfizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße DNA exprimierte Protein bzw. Fusionsprotein zu isolieren und zu reinigen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehendes Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polykonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fusions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Ei der Tiere erhalten werden. Für den monoklonalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit. Ein solcher umfaßt eine oder mehrere der folgenden Komponenten:

- (a) eine erfindungsgemäße DNA,
- (b) eine eine erfindungsgemäße DNA exprimierende Zelle,
- (c) ein erfindungsgemäßes Antikörper-Bindeprotein,
- (d) einen erfindungsgemäßen Antikörper, sowie
- (e) übliche Hilfsstoffe, wie Träger, Puffer, Lösungsmittel, Kontrollen, Marker, Nachweisreagentien für die Komponenten (a)-(d)

Von den einzelnen Komponenten können jeweils ein oder mehrere Vertreter vorliegen. Hinsichtlich der einzelnen Ausdrücke wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen. Diese gelten hier entsprechend.

Die vorliegende Erfindung zeichnet sich dadurch aus, daß von Hybridomzellen produzierte Antikörper auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen präsentiert werden. Dies erfolgt über ein Antikörper-Bindeprotein. Ein solches kann über die zur Herstellung der Hybridomzellen verwendeten Myelomzellen in die Hybridomzellen eingeführt werden. Ferner kann das Antikörper-Bindeprotein über einen es kodierenden Expressionsvektor in die Hybridomzellen eingeführt werden.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, Antikörper zu selektionieren. Dies kann ohne großen Aufwand erfolgen, da Hybridomzellen nicht getrennt kultiviert werden müssen. Vielmehr können komplexe Gemische von Hybridomzellen unmittelbar zur Selektion von Antikörpern verwendet werden. Ferner können Antikörper hinsichtlich ihrer Affinitätsstärke zu bestimmten Antigenen selektioniert wer-

den. Desweiteren eignet sich die vorliegende Erfindung Antikörper von Hybridomzell-Bibliotheken nicht nur gegenüber einem bestimmten Antigen, sondern auch gegenüber vielen (un)bestimmten Antigenen von Antigen-Bibliotheken zu selektionieren.

Somit liefert die vorliegende Erfindung ein Mittel, mit dem u. a. die großen Zeit- und Kosten-Probleme vermieden werden können, die bei der Selektion von monoklonalen Antikörpern bisher auftraten.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 zeigt den erfindungsgemäßen Expressionsvektor pSEX11L4 (Fig. 1(A)), der für ein Antikörper-Bindeprotein kodiert (Fig. 1(B)). Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Fig. 2 zeigt den erfindungsgemäßen Expressionsvektor pSEX11G2 (Fig. 2(A)), der für ein Antikörper-Bindeprotein kodiert (Fig. 2(B)). Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Fig. 3 zeigt den erfindungsgemäßen Expressionsvektor pSEX15G2 (Fig. 3(A)), der für ein Antikörper-Bindeprotein kodiert (Fig. 3(B)). Es wird auf vorstehende Ausführungen verwiesen.

Die Erfindung wird durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1

Herstellung von Myelomzellen, die ein Antikörper-Bindeprotein auf ihrer Zelloberfläche exprimieren.

(A) Transiente Expression

Es werden Zellen der Myelomzelllinie X63-Ag8.653 verwendet. Diese Zellen (10^7) werden mit 20–40 µg des erfindungsgemäßen Expressionsvektors pSEX11G2* (vgl. Fig. 2) transfiziert. Als Transfektionstechnik wird eine Elektroporation durchgeführt, die zwei Pulse zu 2 ms bei 500 V umfaßt. Die Zellen werden 48 h in RPMI-Medium, das 10% FCS enthält, bei 37°C und 5–7,5% CO₂ inkubiert. Danach werden die Zellen mit kaltem DPBS + 0,1% Na-Azid gewaschen, bevor sie 45 min bei 0°C mit DPBS + 0,1% Na-Azid plus 25 µg/ml Ziege anti-Kalb Antikörper (FITC markiert; GAB-FITC, Dianova) inkubiert werden. Nach Waschen mit DPBS + 0,1% Na-Azid werden die Zellen in DPBS + 0,1% Na-Azid + 1 µg/ml Propidium-Jodid inkubiert und nach Anregung mit Blaulicht einer FACS-Analyse unterzogen.

Es zeigt sich, daß die transfizierten Myelomzellen eine grüne Fluoreszenz aufweisen, die durch die transiente Expression eines Antikörper-Bindeproteins auf der Zelloberfläche der Myelomzellen bedingt ist.

(B) Stabile Expression

Die unter (A) erhaltenen Myelomzellen werden einer 14–24 tägigen G418-Selektion unterzogen, bevor sie, wie unter (A) beschrieben, mit GAB-FITC inkubiert und einer FACS-Analyse unterzogen werden. Myelomzellen, die eine starke grüne Fluoreszenz aufweisen, werden weiteren G418-Selektionsrunden unterzogen.

Es wird die Myelomzelllinie X63-Ag8.653.3 erhalten, die stabil ein Antikörper-Bindeprotein auf ihrer Zelloberfläche exprimiert.

Beispiel 2

Herstellung von Hybridomzellen, die auf ihrer Zelloberfläche Antikörper mittels eines Antikörper-Bindeproteins exprimieren

(A) Es werden 10 Balb/c-Mäuse subkutan mit je 100 µg abgetöteten *Helicobacter pylori* Bakterien in komplettem Freund'schen Adjuvans, das abgetötete *Mycobacter tuberculosis* Bakterien enthält, immunisiert. Nach 4 bzw. 7 Wochen erfolgt jeweils eine intraperitoneale Booster-Injektion mit 100 µg abgetöteter *Helicobacter pylori*/*Mycobacter tuberculosis*-Bakterien. Den Mäusen werden vor jeder Immunisierung bzw. nach der letzten Immunisierung jeweils 100 µl Blutserum entnommen und im Westernblot wird die Antigen-spezifische Immunantwort der Maus überprüft. Als Antigen wird ein Aufschluß von bakteriellem Gesamtprotein von *Helicobacter pylori* bzw. *Mycobacter tuberculosis* verwendet. Der Nachweis gebundener Maus-Antikörper wird durch einen Peroxidase-konjugierten Ziege anti-Maus-Antikörper (Dianova) geführt. Mäusen mit einer deutlichen Antigen-spezifischen Immunantwort wird die Milz entnommen und die Lymphozyten werden mit Zellen der Myelomzelllinie X63-Ag8.653.3 von Beispiel 1(B) fusioniert. Die Fusion erfolgt durch Polyethylenglykol (vgl. Goding, J. W., Cell Biology, Biochemistry and Immunology, 3. Auflage, (1996), Verlag Accademic Press Limited, 24–28). Es werden Hybridomzellen erhalten. Diese werden 10–12 Tage in HAT-Medium bei 37°C inkubiert. Es wird die Hybridomzell-Bibliothek 2A erhalten.

Es werden Hexapeptide mit N-terminalem Biotin synthetisiert. Die Peptide entsprechen den 6C-terminalen Aminosäuren von 101 bzw. 118 Genprodukten von *Helicobacter pylori* bzw. *Mycobacter tuberculosis*. Ferner werden 103 Zellen der Hybridomzell-Bibliothek 2A mit kaltem DPBS + 0,1% Na-Azid gewaschen und 45 min bei 0°C mit DPBS + 0,1% Na-Azid + 10 µg/ml der vorstehenden Biotin-markierten Peptide inkubiert. Die Zellen werden mit kaltem DPBS + 0,1% Na-Azid gewaschen und 45 min bei 0°C mit 10 µg/ml Streptavidin-FITC inkubiert. Nach Waschen mit DPBS + 0,1% Na-Azid werden die Zellen in DPBS + 0,1% Na-Azid + 1 µg/ml Propidium-Jodid inkubiert und nach Anregung mit Blaulicht einer FACS-Analyse unterzogen.

Es zeigt sich, daß die Hybridomzellen eine grüne Fluoreszenz aufweisen. Diese Fluoreszenz ist durch die Expression von Antikörpern auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen bedingt. Weiterführende Untersuchungen zeigen, daß die Antikörper eine anti-*Helicobacter pylori*- bzw. *Mycobacter tuberculosis*-Aktivität aufweisen.

(B) Es werden Zellen der Hybridomzelllinie U98/6, die einen Maus-anti-Urokinase-Antikörper produzieren, verwendet. Diese Zellen (10^7) werden mit 20–40 µg des erfindungsgemäßen Expressionsvektors pSEX11G2* (vgl. Fig. 2) transfiziert. Als Transfektionstechnik wird eine Elektroporation durchgeführt, die zwei Pulse zu 2 ms bei 400 V umfaßt. Die Zellen werden 48 h in inkomplettem AIM V-Medium bei 37°C und 5–7,5% CO₂ inkubiert. Danach werden die Zellen mit kaltem DPBS + 0,1% Na-Azid gewaschen, bevor sie 45 min bei 0°C mit DPBS + 0,1% Na-Azid + 10 mg/ml Urokinase-Biotin inkubiert werden. Nach Waschen mit DPBS + 0,1% Na-Azid werden die Zellen in DPBS + 0,1% Na-Azid + 10 µg/ml Streptavidin-FITC inkubiert und nach Anregung mit Blaulicht einer FACS-Analyse unterzogen.

Es zeigt sich, daß die transfizierten Hybridomzellen eine grüne Fluoreszenz aufweisen. Diese Fluoreszenz ist durch die Expression von Antikörpern auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen bedingt. Weiterführende Untersuchungen zeigen, daß die Antikörper eine anti-Urokinase-Aktivität

aufweisen.

Die erhaltenen Hybridomzellen werden einer 14–24 tägigen G418-Selektion unterzogen, bevor sie erneut, wie vorstehend beschrieben mit Urokinase-Biotin und Streptavidin-FICS inkubiert und einer FACS-Analyse unterzogen werden. Hybridomzellen, die eine starke grüne Fluoreszenz aufweisen, werden weiteren G418-Selektionsrunden unterzogen.

Es wird die Hybridomzelllinie U98/6.3.3 erhalten, die stabil Antikörper auf ihrer Zelloberfläche exprimiert.

Beispiel 3

Selektion von monoklonalen Antikörpern, die mittels eines Antikörper-Bindeproteins auf der Zelloberfläche von Hybridomzellen exprimiert werden

10³ Zellen der Hybridomzelllinie U98/6.3.3 von Beispiel 2 (B) werden mit 10⁷ Zellen der Hybridomzelllinie DOB. L1.3 gemischt. Letztere Hybridomzelllinie produziert einen den C-Terminus der humanen HLA-DO- β -Kette erkennenden Antikörper. Dieser wird mittels des gleichen Antikörper-Bindeproteins wie in der Hybridomzelllinie U98/6.3.3 von Beispiel 2(B) auf der Zelloberfläche exprimiert. Das Zellgemisch wird mit kaltem DPBS + 0,1% Na-Azid gewaschen und 45 min bei 0°C mit DPBS + 0,1% Na-Azid + 10 μ g/ml Urokinase-Biotin inkubiert. Nach Waschen mit DPBS + 0,1% Na-Azid wird das Zellgemisch in DPBS + 0,1% Na-Azid + 10 μ g/ml Streptavidin-FITC inkubiert und nach Anregung mit Blaulicht in einen FACS-Sorter gegeben.

Es werden Hybridomzellen mit grüner Fluoreszenz selektiert. In weiterführenden Untersuchungen zeigen diese eine anti-Urokinase-Aktivität. Es werden die Hybridomzelllinien U98/6.3.3 51-S50 erhalten.

Beispiel 4

Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen Antikörper-Bindeproteins

(A) Die DNA von Fig. 1 zwischen den Nukleotid-Nummern 682–1782 wird mit BAMHI-Linkern versehen, mit BamHI nachgespalten und in den mit BamHI gespaltenen Expressionsvektors pQE-8 (Qiagen) inseriert. Es wird das Expressionsplasmid pQE-8/Antikörper-Bindeprotein erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und dem erfindungsgemäßen Antikörper-Bindeprotein von Fig. 1 (C-Terminuspartner). pQE-8/Antikörper-Bindeprotein wird zur Transformation von E.coli SG 13009 (vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265–273) verwendet. Die Bakterien werden in einem LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin und 25 μ g/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60 μ M Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wird eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wird mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der Angaben des Herstellers (Qiagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wird in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wird das Fusionsprotein einer 18% SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J. O. und Kornberg, R. D., J. Mol. Biol. 149 (1975), 709–733).

Es zeigt sich, daß ein erfindungsgemäßes Antikörper-Bindeprotein (Fusionsprotein) in hochreiner Form hergestellt werden kann.

(B) 10⁸ Zellen der in Beispiel 1 (B) erhaltenen Myelomzelllinie X63-Ag8.653.3 werden mit PBS gewaschen, in PBS + 1% Tween 20 aufgenommen und auf Eis inkubiert. Partikuläre Zellbestandteile werden durch Zentrifugation bei 30.000 g abgetrennt und der Überstand wird auf eine IgG Sepharose Säule (IgG Sepharose 6 Fast Flow Lab Pack von Pharmacia) gegeben. Ungebundene Bestandteile werden durch Waschen entfernt und das erfindungsgemäße Antikörper-Bindeprotein wird in saurem pH eluiert.

Nach seiner Neutralisierung wird das Antikörper-Bindeprotein einer 18% SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. vorstehend).

Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes Antikörper-Bindeprotein (Fusionsprotein) in hochreiner Form hergestellt werden kann.

Beispiel 5

Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers

Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 4 wird einer 18% SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M Natriumacetat wird eine ca. 41 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stcke werden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgt, bestimmt wird. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein werden Tiere wie folgt immunisiert:

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung werden 35 μ g gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)

Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)

Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)

Tag 80: Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wird im Immunoblot getestet. Hierzu wird ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 4 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203–209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215–229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wird das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist das Serum des Kaninchens (1 : 10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wird das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper ist ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1 : 5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgen mehrere Waschschritte mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36 μ M 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400 μ M Nitroblau-tetrazolium, 100 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar werden.

Es zeigt sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn 5

Pro Immunisierung werden 40 µg gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 50: 3. Immunisierung (icFA) 10

Aus Eigelb werden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es werden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus 20

Pro Immunisierung werden 12 µg gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung ist das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst. 25

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)
Tag 87: Fusion 30

Überstände von Hybridomen werden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper werden nachgewiesen.

Patentansprüche 40

1. Verfahren zur Selektion von monoklonalen Antikörpern, umfassend die Fusion von B-Lymphozyten mit Myelomzellen zu Antikörperproduzierenden Hybridomzellen, wobei die Antikörper auf der Zelloberfläche der Hybridomzellen mittels eines Antikörper-Bindeproteins präsentiert werden, und die Bindung der Antikörper an Antigene. 45
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei das Antikörper-Bindeprotein ein Signalpeptid, eine von der Spezifität des Antikörpers unabhängige Antikörper-Bindestelle und einen Membrananker umfaßt. 50
3. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Antikörper-Bindeprotein ein Fc-Bindeprotein oder Teile davon umfaßt. 55
4. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Kombination aus Fc-Bindeproteinen oder Teilen davon umfaßt.
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, wobei das Fc-Bindeprotein CD16, CD32 oder CD64 ist. 60
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 2-5, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Antikörper-Bindungsdomäne der Proteine A, G, L oder LG umfaßt.
7. Verfahren nach Anspruch 2, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Kombination aus dem Signalpeptid einer Maus-Ig-Kappa-Kette oder eines Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, einer Antikörper-Bindestelle der Proteine A, G, L oder LG und der Transmembran-

Domäne von PDGFR oder CD52 umfaßt.

8. Verfahren nach Anspruch 7, wobei das Antikörper-Bindeprotein jenes von Fig. 1, Fig. 2 oder Fig. 3 ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-8, wobei die Hybridomzellen Rag 1 und/oder Rag2 (über)exprimieren.

10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-9, wobei die Antigene von einer Antigen-Bibliothek stammen.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, wobei die Antigene an einen Träger gebunden sind.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei der Träger Magnetobeads umfaßt.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-10, wobei die Antigene eine Fluoreszenz- oder Biotinmarkierung umfassen.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die Fluoreszenzmarkierung FITC, TRITC, Cy3, Cy5, Cy5.5, Cy7 und Phycoerythrin umfaßt.

15. Antikörper-Bindeprotein, wobei das Antikörper-Bindeprotein eine Kombination aus dem Signalpeptid einer Maus-Ig-Kappa-Kette oder eines Maus-MHC-Klasse I k(k)-Moleküls, einer Antikörper-Bindestelle der Proteine A, G, L oder LG und der Transmembran-Domäne von PDGFR oder CD52 umfaßt.

16. Antikörper-Bindeprotein nach Anspruch 15, wobei das Antikörper-Bindeprotein die Aminosäuresequenz von Fig. 1, Fig. 2 bzw. Fig. 3 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Aminosäuren unterschiedliche Aminosäuresequenz umfaßt.

17. DNA, kodierend für das Antikörper-Bindeprotein nach Anspruch 16, umfassend:

- (a) die DNA eines Antikörper-Bindeproteins der Fig. 1, 2 bzw. 3, eine sich hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterscheidende DNA, oder
- (b) eine mit der DNA von (a) über den degenerierten Code verwandte DNA.

18. Expressionsvektor, kodierend für die DNA nach Anspruch 17.

19. Zellen, enthaltend den Expressionsvektor nach Anspruch 18.

20. Antikörper, gerichtet gegen das Antikörper-Bindeprotein nach Anspruch 15 oder 16.

Hierzu 15 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

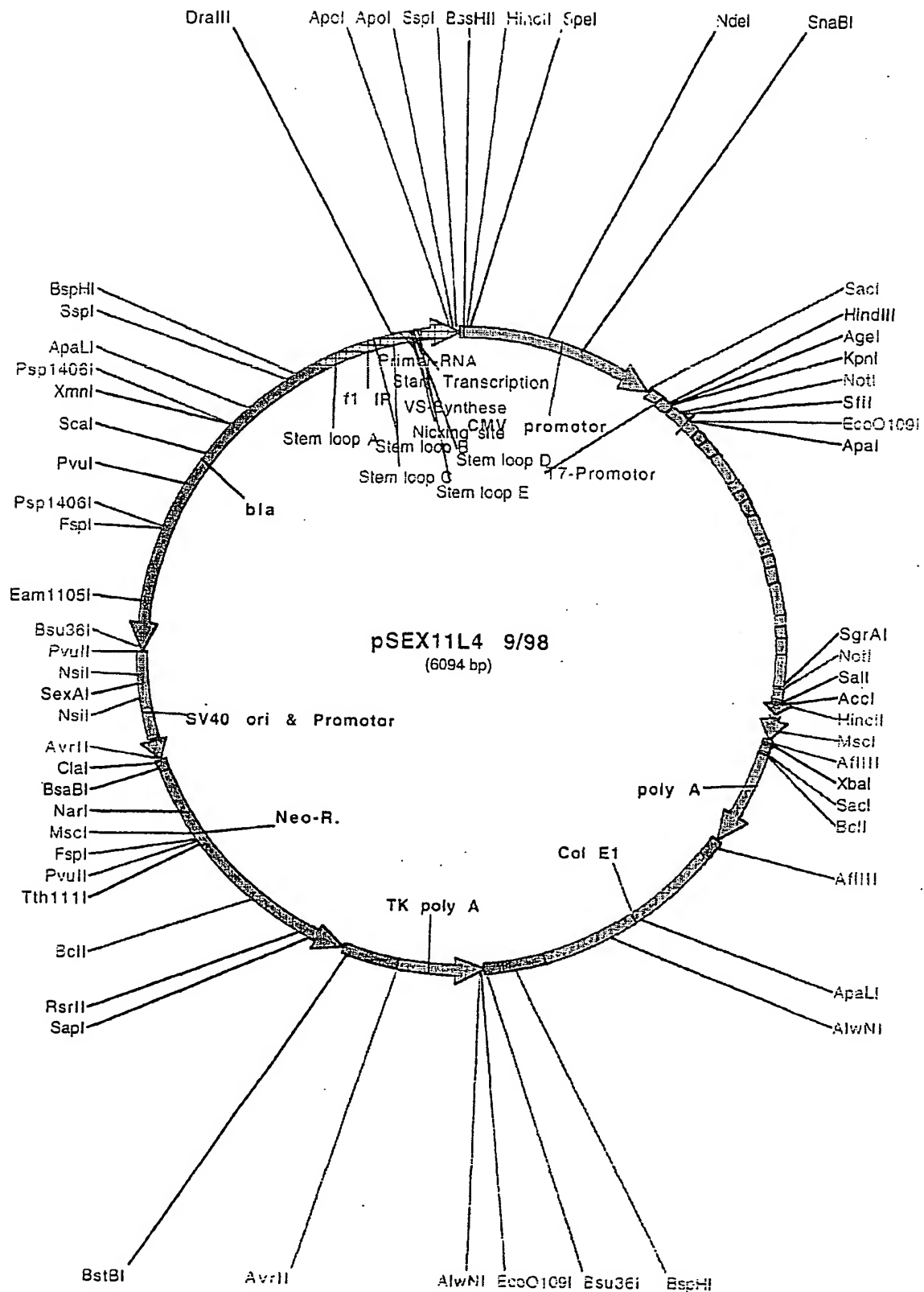


Fig. 1 (A)

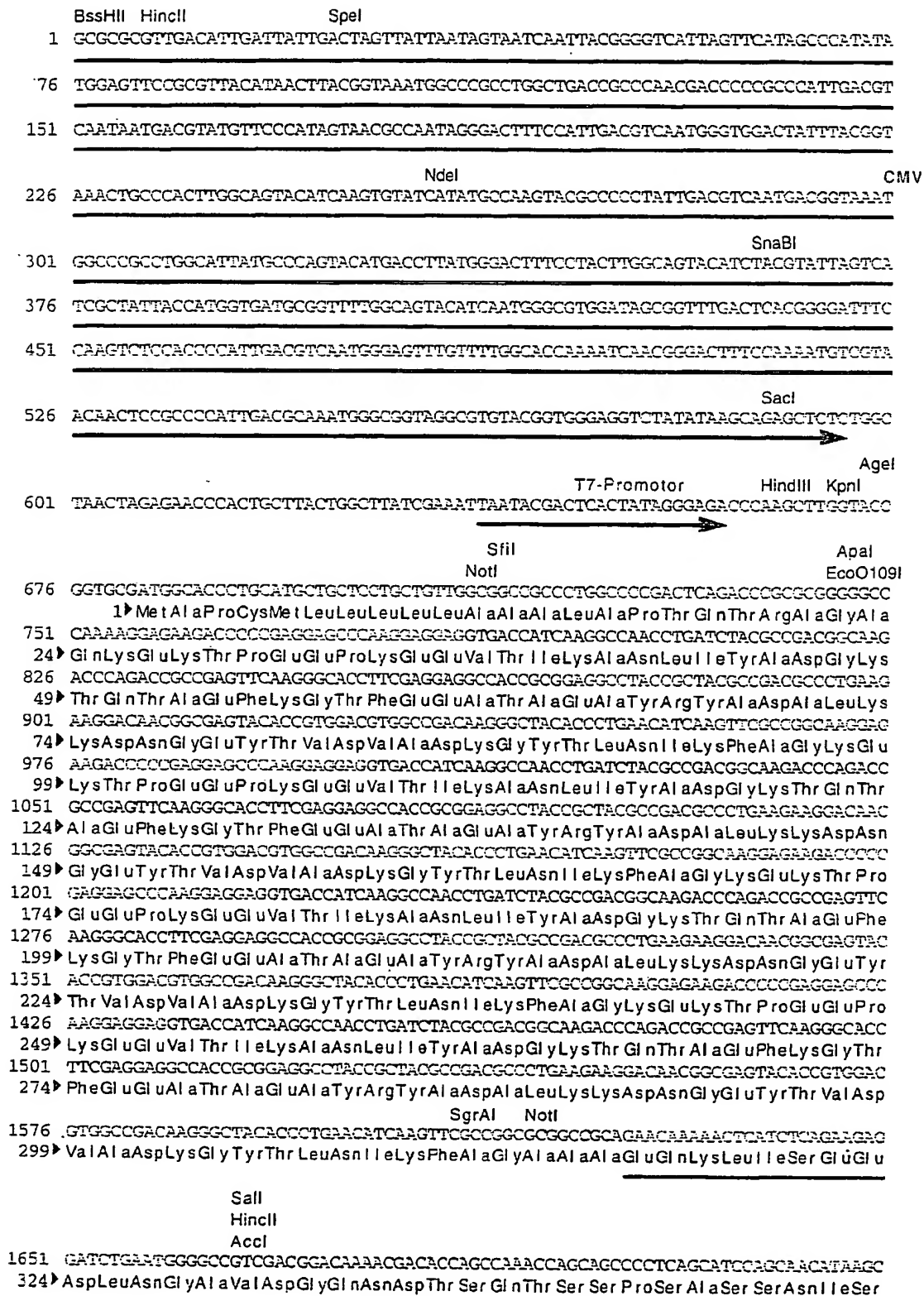


Fig. 1 (B)

1726 GGAGGCATTTTCCTTTTCTTCGTGGCCAATGCCATAATCCACCTCTCTGCTTCAGITGAGGTGACACGCTCTAGA
 349 GlyGlyIlePheLeuPhePheValAlaAsnAlaIleIleHisLeuPheCysPheSer...

1801 GCTATTCTATAGTGTACCTAAATGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCT
 SmaI BclI

1876 GTTGTMTGCCCTCCCGCTGCCTTCCTTGACCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTCTAATAAAATGAG
 poly A

1951 GAATTCGATCGCATTTGTCTCAGTAGGTGTCTATTCTATCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAG
 2026 GATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCACTGGC

2101 GGTAAACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAG
 2176 GAACCGTAAAAAGGCCGCTTGTCTGGGGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGAAT
 2251 CTCAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATATAGATACCAAGGGCTTTCCCCCTGGAAAGCTTCTTCTGAG
 2326 CTCTCTGTTCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTTTCGGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCA

2401 TAGCTACGCTGTAGGTATCTCAGTTCTGCTAGGTCCTTCCTCCAGCTGGGCTGTCTGCAAGAACTCCCGCT
 ApaI

2476 TCAGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTATAGTCCAAACCGGTAAGACAGCACTTATCGCCACT
 Col E1

2551 GGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTACCGAGCGAGGTATGTAGCGGGTCTACAGAGTTCTTTGAAGTGGTGGCC
 AlwNI

2626 TAACTACGGCTACACTAGAGGACAGTATTTGGTATCTCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAGT
 2701 TGGTAGCTCTTGTCCCGCAACCAACCCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAACAGATTACCGC
 2776 CAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGCTCTGACGCTCAGTGGAAACGAAACTCAGC
 BspHI

2851 TTAAGGGATTTTGGTCAATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTAA
 EcoO109I AlwNI

2926 ATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACCTGAGGCTATGGCAGGGCCTGCCGCCCCGAGCTTGGCTGCCAGCCCTGG
 Bsu36I AlwNI

3001 GCCTTCACCCGAACCTTGGGGGGTGGGGTGGGGAAGGAAGAAACCGGGCGTATTGGCCCCAATGGGGTCTCGG
 3076 TGGGGTATCGACAGAGTGCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGCTTTATGAACAAACGACCAACACCGTGGCTTTT
 TK poly A

3151 ATTCTGTCTTTTATTGCGCTCATAGCGGGGTCTCTCCGGTATTGTCTCCTTCCGTGTTTACGTTAGCCTCCC
 3225 CCTAGGTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCCGCGCTGGAGGATCATCCAGCCGGCGTCCCGGAAACCAT
 AvrII

3301 TCCGAAGCCCAACCTTTTCATAGAGGCGCGGTGGAATCCAAATCTCCTGATGGCAGGTGGGGCTGCGTTGGTC
 BstBI

3376 GGTCAATTTGGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGGCGATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCG
 263...PhePheGluAspLeuLeuArgTyrPheAlaIleArgGlnSerAspP
 SapI

3451 GGAGCGCGGATACCGTAAAGCAAGAGGAGCGGTACGCCATTCCGCCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTA
 246...roAlaAlaIleGlyTyrLeuValLeuPheArgAspAlaTrpGluGlyGlyLeuGluAlaIleAspArgThrA
 RsrII

3526 GCCAACGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGGCCACAGTCGATGAATCCAGAAAAGCGGCCATTT
 221...laLeuAlaIleAspGlnTyrArgAspAlaValGlyLeuArgGlyCysAspIlePheGlySerPheArgGlyAsnG

Fig. 1 (B) Fortsetzung I

3601 TCCACCATGATATTTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACCGCGAATCTCGCCGTGCGCCATGCTCGCCTTG
 1964 I uVal Met I l eAsnProLeuCysAl aAspGlyHisThrValValLeuAspGlyGlyAspProMetSerAlaLysL
 BclI
 3676 AGCCTGGCGAACAGTTTCGGCTGGCGGAGCCCTGATGCTCTTGATCATCTGATCGACAAGACCGGCTTCCATC
 1714 euArgAlaPheLeuGluAlaProAlaLeuGlyGlnHisGluGluAspAspGluAspValLeuGlyAlaGluMetA
 3751 CGAGTACGTGCTCGCTCGATCGCATGTTTCGCTTGGTGGTCCGATGGGACAGGTAGCCGATCAAGCGTATGCAGC
 1464 r gThrArgAlaArgGlu l l eArgHisLysAlaGlnHisAspPheProCysThrAlaProAspLeuThrHisLeuA
 3826 CGCCGATTTGCATCAGCCATGATGGATCTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAGATCCTGCCCGGC
 1214 r gArgMetAlaAspAlaMet l l eSerValLysGluAlaProAlaLeuHisSerSerLeuLeuAspGluGlyProV
 Tth111I PvullFspI
 3901 ACTTCGCCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCAGAGTGGCGAAGGAACGCCCTC
 964 alGluGlyLeuLeuTrpAspArgGlyAlaGluThrValValAspLeuValAlaAlaCysProValGlyThrT
 Neo-R.
 MscI
 3976 GTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCTCGTCTTGACAGTTTCAGGGCACCGGACAGGTGGTCTTGACAAA
 714 hrAlaLeuTrpSerLeuArgAlaAlaGluAspGluLeuGluAsnLeuAlaGlySerLeuAspThrLysValPheL
 NarI
 4051 AGAACCGGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGGAACCGGCGCATCAGAGCAGCCGATTGCTGTGTGTCGCCAGTCA
 464 euValProArgGlyGluAlaSerLeuArgPheValAlaAlaAspSerCysGly l l eThrGlnGluAlaTrpAspT
 BsaBI
 4126 TAGCCGAATAGCCTCTCCACCCAAAGCGCGGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCATCATGCCAAACGAT
 214 y rGlyPheLeuArgGluValTrpAlaAlaProSerGlyAlaHisLeuGlyAspGluGlu l l eMet
 ClaI AvrII
 4201 CCTCATCTGTCTCTTGATCGATCTTTGCAAAAGCCTAGGCTCCAAAAAGCCTCCTCACTACTTCTGGATAG
 4276 CTCAGAGGCCGAGGAGGCGGCTCGCCTCTGCATAAATAAAAAAATTAGTCAGCCATGGGCGGACAATGGGC
 SV40 ori & Promotor NsiI
 4351 GGAACCTGGGCGGAGTTAGGGGCGGGATGGGCGGAGTTAGGGCGGGACTATGGTTGCTGACTAATTGAGATGCAT
 SexAI NsiI
 4426 GCTTTGCATACTTCTGCCTGCTGGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTGGTTGCTGACTAATTGAGATGCATGCT
 Pvull
 4501 TTGCATACTTCTGCCTGCTGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTAACTGACACACATTCCACAGCTGGTTCTT
 Bsu36I
 4576 TCCGCTCAGGACTCTTCCTTTTTCATAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCA
 2874...Trp
 Eam1105I
 4651 ATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCTGACTCCCGTCGT
 2854 HisLys l l eLeuSerAlaGly l l eGluAla l l eGluArgAsnArgGluAspMetThrAlaGlnSerGlyThrThr
 4726 GTAGATACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACC
 2604 Tyr l l eValVal l l eArgSerProLysGlyAspProGlyLeuAlaAla l l e l l eGlyArgSerGlyArgGluGly
 4801 GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACACGCCAGCCGGAAGGCGGAGCGCAGAGTGGTCTGCAACTTTATCCGC
 2354 AlaGlySerLysAspAla l l ePheTrpGlyAlaProLeuAlaSerArgLeuLeuProGlyAlaValLysAspAla
 FspI Psp1406I
 4876 CTCCATCCAGTCTATTAAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTGCGCAGTTAATAGTTTTCGCGCAACGTTGT
 2104 GluMetTrpAsp l l eLeuGlnGlnArgSerAlaLeuThrLeuLeuGluGlyThrLeuLeuLysArgLeuThrThr
 4951 TGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCCCGTTCCCAACGATC
 1854 AlaMetAlaValProMetThrThrAspArgGluAspAsnPro l l eAlaGluAsnLeuGluProGluTrpArgAsp
 Pvul
 5026 AAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAG
 1604 LeuArgThrValHisAspGlyMetAsnHisLeuPheAlaThrLeuGluLysProGlyGly l l eThrThrLeuLeu
 5101 TAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAG
 1354 LeuAsnAlaAlaThrAsnAspSerMetThr l l eAlaAlaSerCysLeuGluArgValThrMetGlyAspThrLeu
 bla Scal
 5176 ATGCTTTTCTGTGACTGGTACTCAACCACTCATCTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTG
 1104 HisLysGluThrValProSerTyrGluValLeuAspAsnGlnSerTyrHis l l eArgArgGlyLeuGlnGluGln
 Fsp1406I
 XmnI
 5251 CCCGCGTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTCATTTGGAACCGTTCTTC
 854 GlyAlaAsp l l eArgSerLeuValAlaGlyCysLeuLeuValLysPheThrSerMetMetProPheArgGluGlu

Fig. 1 (B) Fortsetzung II

5326 GGGGCGAAACTCTCAAGCATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATC
 604 ProArgPheSer Gl uLeu l l eLysGlySerAsnLeuAspLeuGl u l l eTyrGlyValA rgAl aGl yLeuGl nAsp
 5401 TTCAGCATCTTTTACTTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGCGAAT
 354 Gl uAl aAspLysVal l LysVal l LeuThr Gl uProHi sAl aPheVal ProLeuCysPheAl aAl aPhePhePro l l e
 SspI
 5476 AAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTG
 104 LeuAl aValA rgPheHi sGl n l l eSerMet
 BspHI
 5551 TCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGGAAA
 5626 AGTGCCACCTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGTTGGTTACGCGCAGCGTGCACCGCTAC
 Stem loop A
 5701 ACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCGCTTCTTCCTTCCTTTCTCGCCACGTTGCGCGGGCTTTCCCGG
 f1 IR Stem loop B
 5776 TCAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGA
 DralI Stem loop C Primer-RNA Start Tran:
 5851 TTAGGGTGATGGTTCCAGTAGTGGGCCATCGCCCTCATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGAGGTTCACGTT
 VS-Synthese
 Nicking site Stem loop D Stem loop E
 5926 CTTTATAGTGGACTCTTGTTCGAACTGGACCAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGC
 Apol Apol SspI
 6001 GATTTTGCCGATTTGGCCCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAACAATAATTTAACGCGAATTTTAACAAAT
 6076 ATTAACGCTTACAATTTAC

Fig. 1 (B) Fortsetzung III

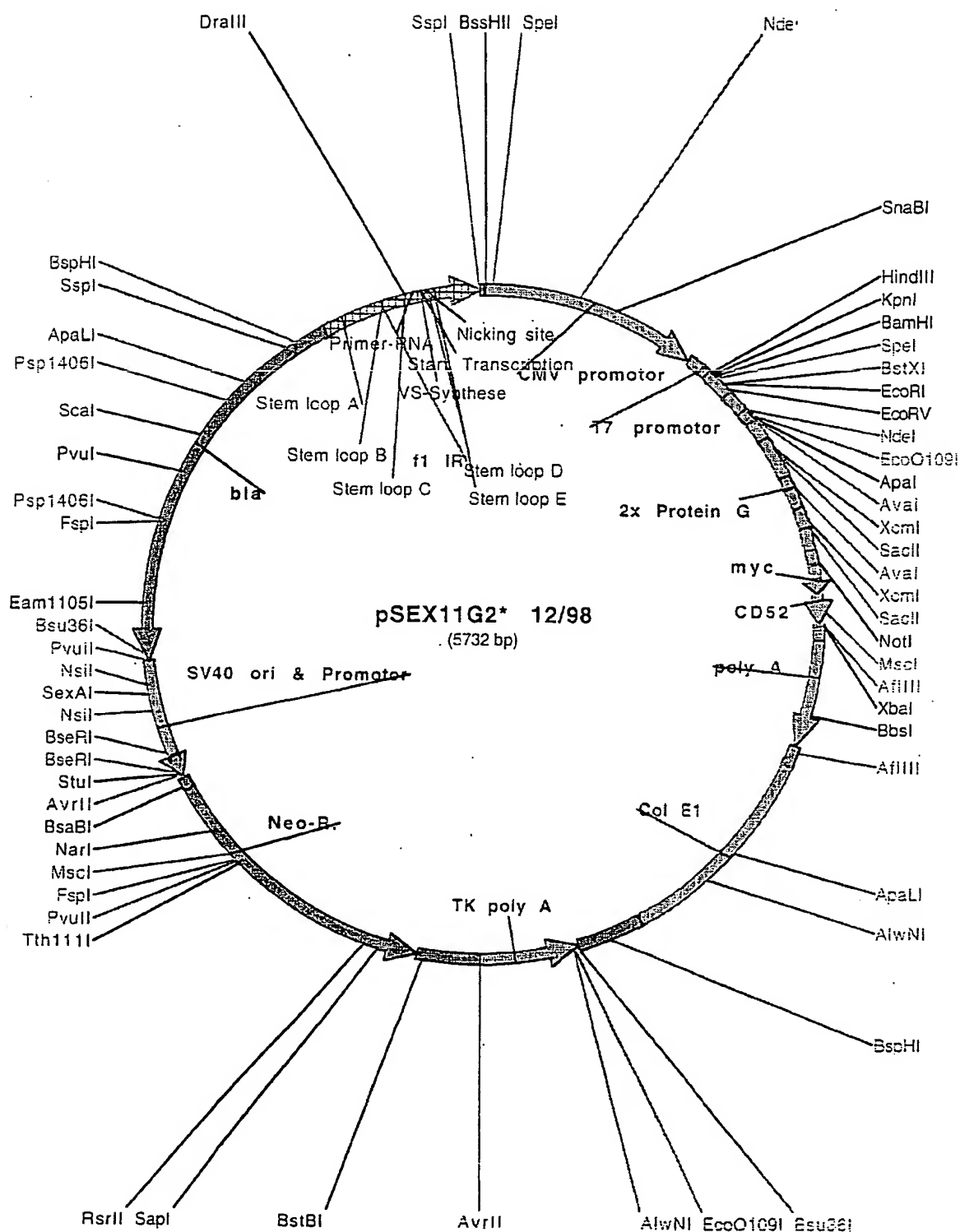


Fig. 2 (A)

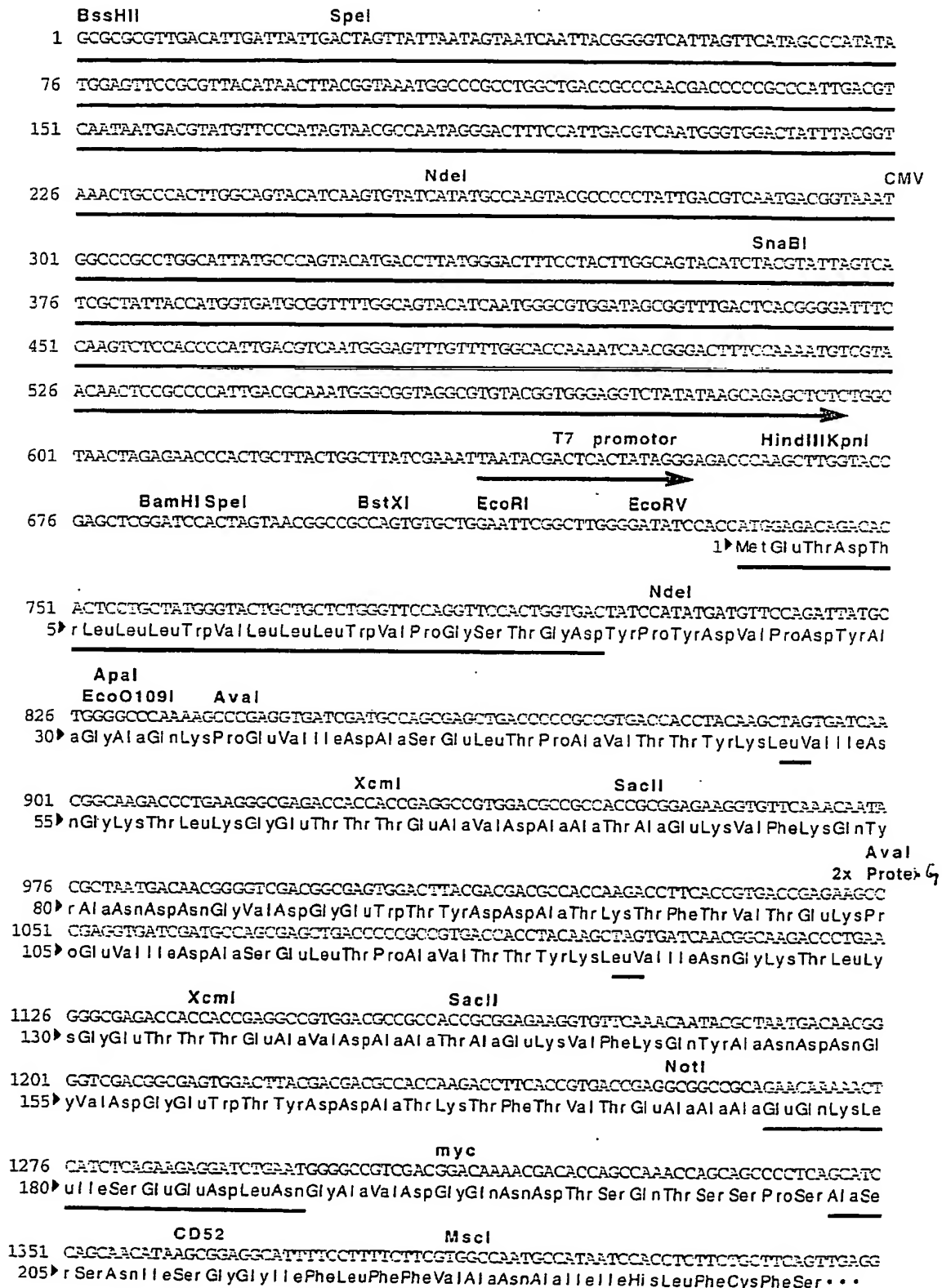


Fig. 2 (B)

AflIIIXbaI
 1426 TGACACGCTCTAGAGCTATTCTATAGTGTACCTAAATGCTAGAGCTGGCTGATCAGUCTGACTGTGCCTTCTAG
 ————— ← —————

1501 TTGCCAGCCATCTGTGTGTTGCCCCCTCCCCCGTGCCTTCTCTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTTCTC
 ————— poly A

1576 CTAATAAAATGAGGAAATTCATCGCATTTGTCTGAGTAGGTGTCAATCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGA
 —————

BbsI
 1651 CAGCAAGGGGGAGGATTGGGAGACATATAGCAGGCATGCTGGGGATCGCGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGA
 —————

AflIII
 1726 AAGAACCAGTGGCGGTAAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAATGTGAGCAAAAGGCC
 1801 AGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGCCCGTGTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATC
 —————

1876 ACAPAAATCGACCCCTCAAGTCAGAGGTGGCGAACCCTGACAGGACTATTAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGAAA
 —————

1951 GCTCCCTCTGTGGCTCTCTGTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTCTCCGCTTTCTCCCTTCCGGAAGCG
 —————

Apal
 2026 TGGCGCTTTCTCATAGCTCAGCTCTAGGTATCTCAGTTCCGGTGTAGGTCTGTTCCGCTCCAGCTGGGCTGTGTGC
 —————

Col E1
 2101 ACGPACCCCCCGTTCCGCCCGACCGCTCCGCCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACG
 —————

AlwNI
 2176 ACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGTAACAGGATTAGCAGAGCCAGGTATGTAGCGGCTGCTACAGATTTCT
 —————

2251 TGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAGGACAGTATTTGGTATCTCCGCTCTGCTGAGCCAGTTACCT
 —————

2325 TCGGAAPAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGCCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGTTTTTTTGTGTTGCAAGC
 —————

2401 AGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGA
 —————

BspHI
 2476 ACGAAACTCAGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTAAATTAAA
 —————

EcoO109I
 2551 AATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACCTGAGGCTATGGCAGGGCTGCCGCCCGACGTTGG
 ————— **Bsu36I** **AlwNI**

2626 CTGCGAGCCCTGGGCCTTACCCGAACCTGGGGGTGGGGTGGGGAAGGAAGAACGCGGGCGTATTGGCCCC
 —————

TK poly A
 2701 AATGGGGTCTCGGTGGGGTATCGACAGAGTGCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGCTTTATGAACAAACGACCCAA
 —————

2776 CACCGTCCGTTTTATTCTGTCTTTTATTGCGCTCATAGCGCGGTTCTTCCGGTATTGTCTCTCTCCGRTTT
 —————

AvrII
 2851 CAGTTAGCCTCCCCCTAGGGTGGGCGAAGAACTCCAGCATGAGATCCCCGGCTGGAGGATCATCCAGCCGCGT
 —————

2926 CCCGAAACGATTCCGAAGCCCAACCTTTATAGAAGGGCGCGGTGGAATCGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGG
 —————

BstBI
 3001 GCGTCGCTTGGTCCGTCAATTCGAACCCAGAGTCCCGCTCAGAAGAACTCGTCAAGAAGCGATAGAAGCGAT
 —————
 263 PhePheGluAspLeuLeuArgTyrPheAlaIle

SapI
 3075 GCGCTGCGAATCGGGAGCGGGGATACCGTAAAGCAGGAGGCGGTGAGCCCATTCGCCGCCAGGCTCTTCAGC
 251 ArgGlnSerAspProAlaAlaIleGlyTyrLeuValLeuPheArgAspAlaTrpGluGlyLeuGluAlaIle
 —————

RsrII
 3151 AATATCAGCGGTAGCCACCGCTATGTCTGATAGCGGTCCGCCACACCCAGCCGCCACAGTCCGATGAATCCAGA
 226 IleAspArgThrAlaLeuAlaIleAspGlnTyrArgAspAlaValGlyLeuArgGlyCysAspIlePheGlySer
 3226 AAAGCGGCCATTTTCCACCATGATATTCGGCAAGCAGGCATCGCCATGGGTACGACGAGATCCTCGCGTCCGG
 201 PheArgGlyAsnGluValMetIleAsnProLeuCysAlaAspGlyHisThrValValLeuAspGluGlyAspPro

Fig. 2 (R) Fortsetzung T

3301 CATGCTCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTTCGGCTGGCGAGCCCTGATGCTCTTGAATCATCTGATCGACAAG
 176 Met Ser AlaLysLeuArgAlaPheLeuGluAlaProAlaLeuGlyGlnHisGluGlnAspAspGlnAspValLeu
 3376 ACCGGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGCTTGGTGGTGAATGGGCAGGTAGCCGGATC
 151 GlyAlaGluMetArgThrArgAlaArgGluIleArgHisLysAlaGlnHisAspPheProCysThrAlaProAsp
 3451 AAGCGTATGCAGCCGCCGCAATTGCATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGAGCAAGGTGAGATGACAGGAG
 126 LeuThrHisLeuArgArgMetAlaAspAlaMetIleSerValLysGluAlaProAlaLeuHisSerSerLeuLeu
 FspI
 Tth111I PvulI
 3526 ATCCTGCCCCGGCACTTTCGCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCACAGCTGCGCA
 101 AspGlnGlyProValGluGlyLeuLeuLeuTrpAspArgGlyAlaGluThrValValAspLeuValAlaAlaCys
 Neo-R.
 MscI
 3601 AGGAACGCCCGTCTGTCGCCAGCCAGATAGCCGCGCTGCTCGTCTTGCAGTTTCATTAGGGCACCAGCAGGTC
 76 ProValGlyThrThrAlaLeuTrpSerLeuArgAlaAlaGluAspGlnLeuGluAsnLeuAlaGlySerLeuAsp
 NarI
 3676 GGTCTTGACAAAAGAACCGGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGCAGCCGATTGTCTG
 51 ThrLysValPheLeuValProArgGlyGlnAlaSerLeuArgPheValAlaAlaAspSerCysGlyIleThrGln
 3751 TTGTGCCCAGTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCAAGCGCGGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCAT
 26 GlnAlaTrpAspTyrGlyPheLeuArgGluValTrpAlaAlaProSerGlyAlaHisLeuGlyAspGlnGluIle
 StuI
 BsaBI AvrII BseRI
 3826 CATGCGAAACGATCCTCATCCTGTCTCTTGTATCGATCTTTGCAAAAGCCTAGGCCTCCAAAAAGCCTCCCTCACT
 1 Met
 BseRI
 3901 ACTTCTGGAAATAGCTCAGAGCCGAGGAGCGCCCTCGGCCTCTGCATAAATAAAAAAATTASTCAGCCATGGC
 SV40 ori & Promotor
 3976 GCGGAGAAATGGGCGGAACCTGGGCGGAGTTAGGGGCGGAGTGGCGGAGCTTAGGGGCGGAGCTATGTTGCTGACT
 NsiI SexAI
 4051 AATTGAGATGCATGCTTTGCATACCTTCTGCCTGCTGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTGGTTGCTGACTAAT
 NsiI
 4126 TGAGATGCATGCTTTGCATACCTTCTGCCTGCTGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTAACTGACACACATTCC
 PvulI Bsu36I
 4201 ACAGCTGGTTCTTTCCGCCCTCAGGACTCTTCCTTTTTCATTAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGT
 4276 CTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTTCATCCATAGTTGCGCT
 287 T...TrpHisLysIleLeuSerAlaGlyIleGluAlaIleGlnArgAsnArgGluAspMetThrAlaGlu
 Eam1105I
 4351 GACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAG
 264 nSerGlyThrThrTyrIleValValIleArgSerProLysGlyAspProGlyLeuAlaAlaIleIleGlyArgSer
 4426 ACCCAGCTCACCAGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCGCGGAGGGCCGAGCGCAGAGTGGTCTCTG
 239 rGlyArgGluGlyAlaGlySerLysAspAlaIlePheTrpGlyAlaProLeuAlaSerArgLeuLeuProGlyAla
 4501 CAACTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTGTGCGCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTT
 214 aValLysAspAlaGluMetTrpAspIleLeuGlnGlnArgSerAlaLeuThrLeuLeuGluGlyThrLeuLeuLy
 FspI Psp1406I
 4576 TGCAGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTAGCTCCG
 189 sArgLeuThrThrAlaMetAlaValProMetThrThrAspArgGluAspAsnProIleAlaGluAsnLeuGluPro
 PvulI
 4651 GTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCTTCGGTCCCTCCGA
 164 oGluTrpArgAspLeuArgThrValHisAspGlyMetAsnHisLeuPheAlaThrLeuGluLysProGlyGlyIle
 4726 TCGTTGTGTCAGTAAGTTGGCCGCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAAATCTCTCTACTGTCA
 139 eThrThrLeuLeuLeuAsnAlaAlaThrAsnAspSerMetThrIleAlaAlaSerCysLeuGluArgValThrMe
 bla Scal
 4801 TGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGTGACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGCGGAC
 114 tGlyAspThrLeuHisLysGluThrValProSerTyrGluValLeuAspAsnGlnSerTyrHisIleArgArgGlu
 4876 CGAGTTGCTCTTGGCCGCGCTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGTCTCATCTTG
 89 yLeuGlnGluGlyAlaAspIleArgSerLeuValAlaGlyCysLeuLeuValLysPheThrSerMetMetPro
 Psp1406I
 4951 GAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCCATGTAACCCACTCGTG
 64 oPheArgGluGluProArgPheSerGluLeuIleLysGlySerAsnLeuAspLeuGluIleTyrGlyValArgAla

Fig. 2 (B) Fortsetzung II

5026 CACCCA^{ACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTT} TGG^{GTGAGCAAAACAGG} ^{AGSCAAAATGCCG}
 394 aGlyLeuGlnAspGluAlaAspLysValLysValLeuThrGluProHisAlaPheValProLeuCysPheAlaAla

SspI

5101 CAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTTCAATATTATTGAAGCATTT
 144 aPhePheProIleLeuAlaValArgPheHisGlnIleSerMet

BspHI

5176 ATCAGGGTTATTGTCTCATGACGGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCCCA
 5251 CATTTCCCGGAAAAGTGCCACCTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAACGCGGGGGTGTGGTGGTTACGGGCA

Stem loop A

5326 GCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCCG

f1 IR

Stem loop B

5401 CCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTTGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTGGAAC

Dralll

Stem loop C

Primer-RNA

5476 CCAAAA^{ACTTGATTAGGGTGATGGGTTACCGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTGAAGT}

Start Transcription

VS-Synthese Nicking site Stem loop D

Stem loop E

5551 TGGAGTCCACGTTCTTTTATAGTGGACTCTTCTTCCAAACTGGAAACACACTCAACCCCTATCTCGGTCTATTCTTT

5626 TTGATTTATAGGGATTTTCCCGATTTCCGCCCTATTGCTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAAACGCGA

SspI

5701 ATTTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAC

Fig. 2 (B) Fortsetzung III

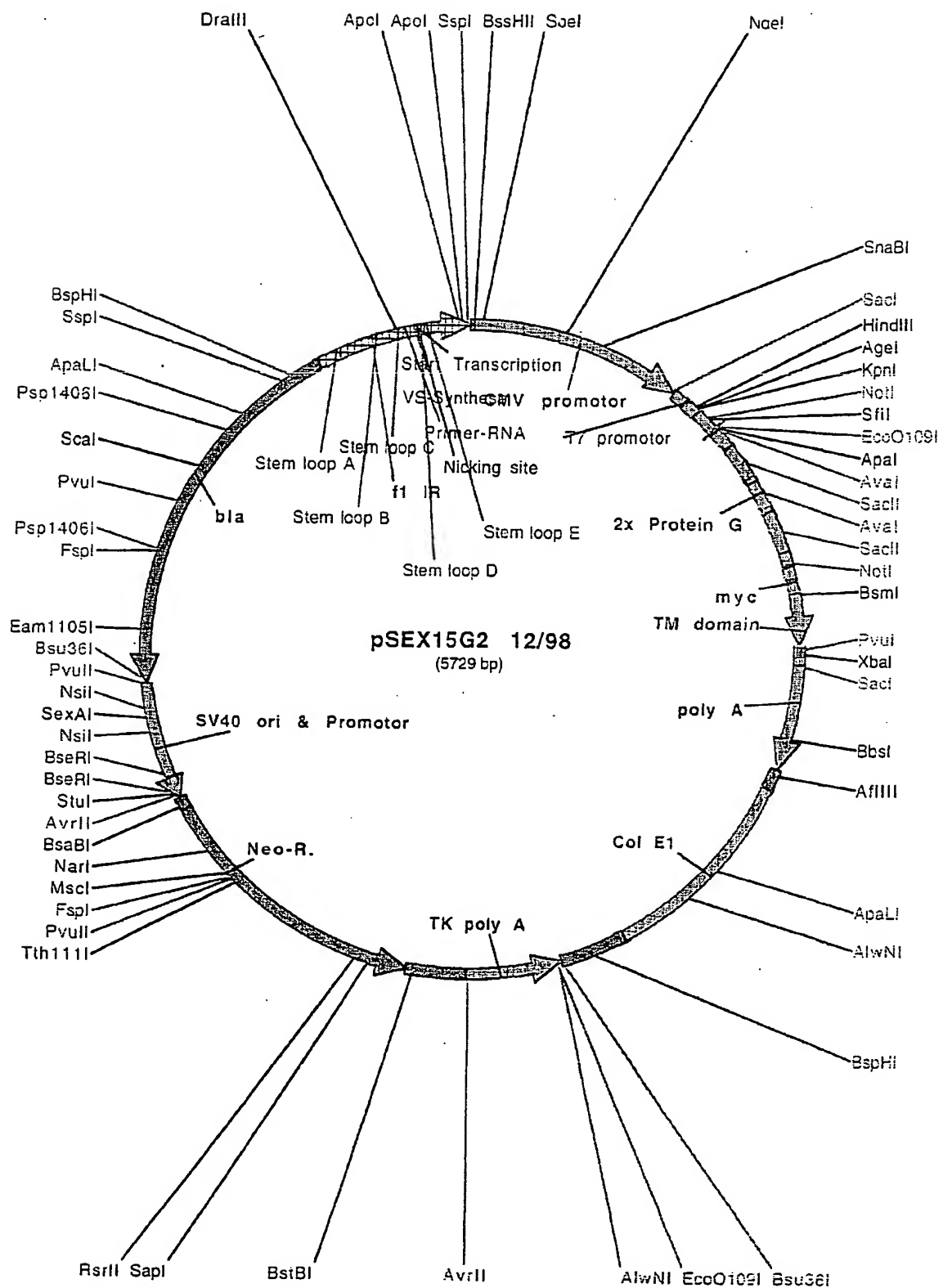


Fig. 3 (A)

Fig. 3 (B)

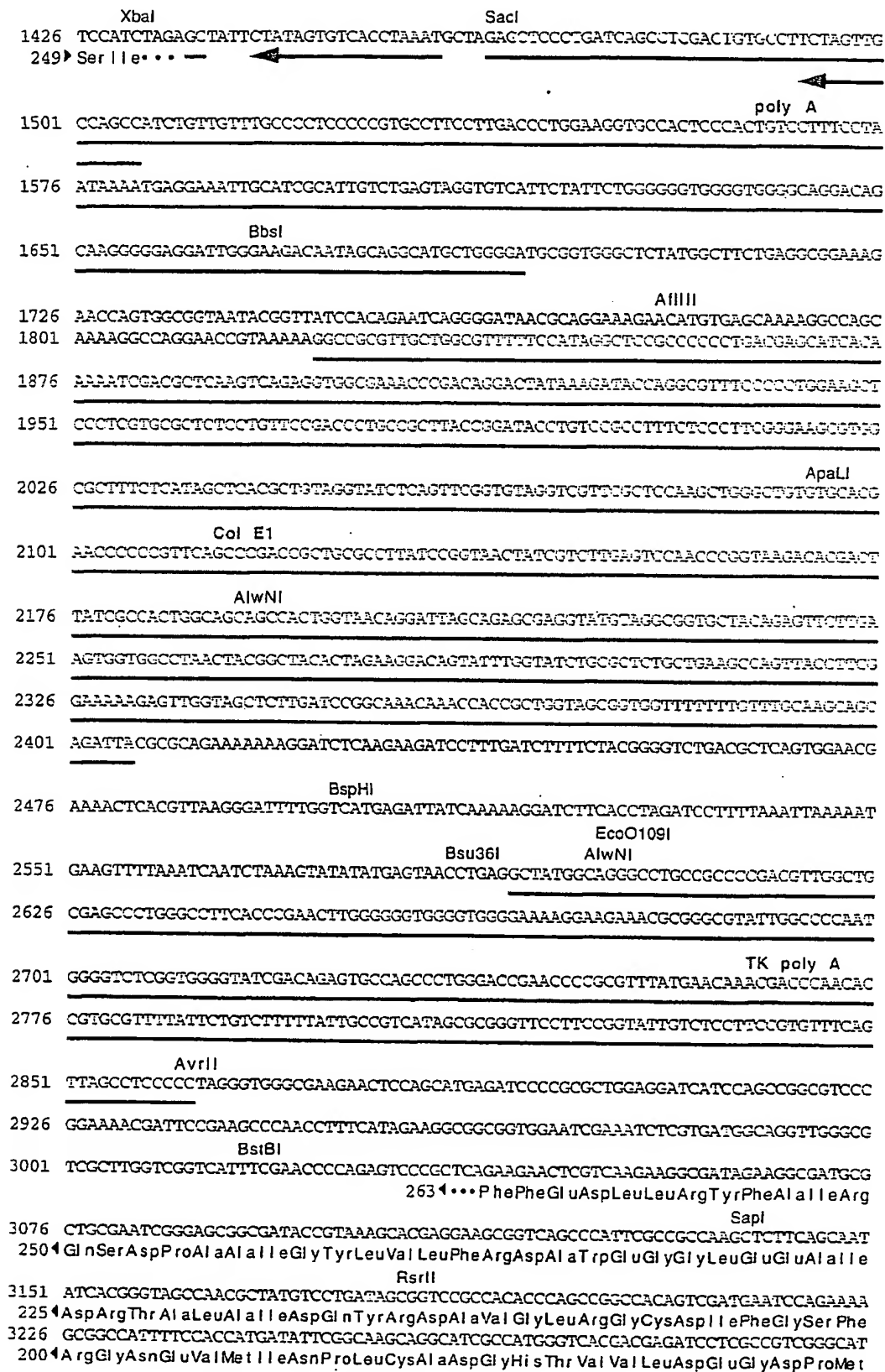


Fig. 3 (B) Fortsetzung I

3301 GCTCGCCTTGAGCCTGGCGAACAGTTTCGGCTGGCGCGAGCCCCTGCTGCTCTGATCTCTCTGATCGACAAGACC
 175 Ser Al aLysLeuArgAl aPheLeuGl uAl aProAl aLeuGl uAl nHl sGl uGl nAspAspCl nAspVal LeuGl y
 3376 GGCTTCCATCCGAGTACGTGCTCGCTCGATGCGATGTTTCGGCTGGTGGTTCGAATGGGCAGGTAGCCGGATCAAG
 150 Al aGl uMet ArgThr ArgAl aArgGl uAl eArgHl sLysAl aGl nHl sAspPheProCysThr Al aProAspLeu
 3451 CGTATGCAGCCGCCGATTGCATCAGCCATGATGGATACTTTCTCGGCAGGACGAAGGTGAGATGACAGGAGATC
 125 Thr Hl sLeuArgArgMet Al aAspAl aMet l l eSer Val LysGl uAl aProAl aLeuHl sSer Ser LeuLeuAsp
 Tth111I PvuII FspI
 3526 CTGCCCCGGCACTTCGCCCAATAGCAGCCAGTCCCTTCCCGCTTCAGTGACAACGTCGAGCAGCTGCGCAAGG
 100 Gl nGl yProVal Gl uGl yLeuLeuLeuTrpAspArgGl yAl aGl uThr Val Val AspLeuVal Al aAl aCysPro
 Neo-R.
 MscI
 3601 AACGCCCGCTCGTGGCCAGCCACGATAGCCGCGCTGCCCTGCTTGCAGTTTCATTACGGGCACCGGACAGGTTCGGT
 75 Val Gl yThr Thr Al aLeuTrpSer LeuArgAl aAl aGl uAspGl nLeuGl uAsnLeuAl aGl ySer LeuAspThr
 NarI
 3676 CTTGACAAAAAGAACCGGGCGCCCTGCGCTGACAGCCGGAACACGGCGGCATCAGAGCAGCCGATTGTCTGTGTG
 50 LysVal PheLeuVal ProArgGl yGl nAl aSer LeuArgPheVal Al aAl aAspSer CysGl y l l eThr Gl nGl n
 3751 TGCCCACTCATAGCCGAATAGCCTCTCCACCCCAAGCGCCGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTCAATCAT
 25 Al aTrpAspTyrGl yPheLeuArgGl uVal TrpAl aAl aProSer Gl yAl aHl sLeuGl yAspGl nGl u l l eMet
 StuI
 BsaBI AvrII BseRI
 3825 GCGAAACGATCCTCATCTCTCTTTCATCGATCTTTGCAAAAGCCTAGGCCTCCAAAAAGCCTCCTCACTACT
 BseRI
 3901 TCTGGAATAGCTCAGAGGCCGAGGAGCGCCCTCGGCCTCTGCATAAATAAAAAAATTAGTCAGCCATCGGGGCG
 SV40 ori & Promotor
 3975 GAGAATGGGCGGAAGTGGGCGAGTTAGGGGCGGGATGGGCGGAGTTAGGGGCGGGACTATGTTTGTGACTAAT
 NsiI SexAI
 4051 TGAGATGCATGCTTTGCATCTTCTGCCTGCTGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCTGGTTGCTGACTAATGA
 NsiI PvuII
 4126 GATGCATGCTTTGCATCTTCTGCCTGCTGGGAGCCTGGGGACTTTCCACACCCTAACTGACACACATTCCACA
 Bsu36I
 4201 GCTGGTCTTTCCGCCCTCAGGACTCTTCCTTTTCAATAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTG
 Eam11I
 4276 ACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCCTGAC
 287 LysHl sLys l l eLeuSer Al aGl y l l eGl uAl a l l eGl nArgAsnArgGl uAspMet Thr Al aGl nSe
 4351 TCCCGTCTGTAGATACTACGATACGGGAGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACC
 263 r Gl yThr Thr Tyr l l eVal Val l l eArgSer ProLysGl yAspProGl yLeuAl aAl a l l eGl yA rgSer Gl
 4426 CACGCTCACC GGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCGCA
 238 yA rgGl uGl yAl aGl ySer LysAspAl a l l ePheTrpGl yAl aProLeuAl aSer ArgLeuLeuProGl yAl aVa
 FspI
 4501 CTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAAATTGTCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGC
 213 l LysAspAl aGl uMet TrpAsp l l eLeuGl nGl nArgSer Al aLeuThr LeuLeuGl uGl yThr LeuLeuLysAr
 Psp1406I
 4576 GCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTGTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTT
 188 gLeuThr Thr Al aMet Al aVal ProMet Thr Thr AspArgGl uAspAsnPro l l eAl aGl uAsnLeuGl uProGl
 PvuI
 4651 CCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCG
 163 uTrpArgAspLeuArgThr Val Hl sAspGl yMetAsnHl sLeuPheAl aThr LeuGl uLysProGl yGl y l l eTh
 4726 TTGTGAGAAGTAAGTTGGCGCAGTGTATCACTCATGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGC
 138 r Thr LeuLeuLeuAsnAl aAl aThrAsnAspSerMet Thr l l eAl aAl aSer CysLeuGl uArgVal Thr Met Gl
 bla Scal
 4801 CATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAATCAACCAAGTCATCTTGACAATAGTGTATGCGGCGACCGA
 113 yAspThr LeuHl sLysGl uThr Val ProSer TyrGl uVal LeuAspAsnGl nSer TyrHl s l l eArgArgGl yLe
 4876 GTTGCTCTTGGCCGGCGCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAAGTTTAAAGTCTCATCTTGGAA
 88 uGl nGl uGl nGl yAl aAsp l l eArgSer LeuVal Al aGl yCysLeuLeuVal LysPheThr SerMetMet ProPh
 Psp1406I
 4951 AACGTTCTTGGGGCGGAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAAACCACTCTGTCAC
 63 eArgGl uGl uProArgPheSer Gl uLeu l l eLysGl ySerAsnLeuAspLeuGl u l l eTyrGl yVal A rgAl aGl

Fig. 3 (8) Fortsetzung II

5026 CCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTCACCAGCGTTTCTG-3GTG-AGC?AAACACAGCAAGCCAA?ATGCCGCAA
 384 yLeuGl nAspGl uAl aAspLysVal LysVal LeuThr Gl uProHi sAl aPhcVal :?roLeuCysFheAl aAl aPh
 SspI
 5101 AAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCATATTATTGAAGCATTATC
 134 ePheProIleLeuAl aValA rgPheHi sGl nIleSerMet
 BspHI
 5176 AGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACAT
 5251 TTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCGACCG
 Stem loop A
 5326 TGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTGCGCTTTCTTCCTTTCCTTTCTGCGCACGTTGGCGG
 f1 IR Stem loop B
 5401 GCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTCTAGTGTCTTTACGCGCACCTGGAACCCCA
 DrallI Stem loop C Primer-RNA
 5476 AAAAAGTTGATTAGGGTGATGGTTCAAGTACTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTTCGCCCTTTTGAAGTTGG
 Start Transcription
 VS-Synthese Nicking site Stem loop D Stem loop E
 5551 AGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTTTCCAAACTGGAPCAACACTCAACCCTATCTCGGTCTACTCTTTTTC
 Apol Apol
 5626 ATTTATAAGGGATTTTGGCGATTTCGGCCTATTGCTTAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAAGCGCAATT
 SspI
 5701 TTAACAAAAATTTAAGCCTTACAATTTAC

Fig. 3 (B) Fortsetzung III